

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ *PENIOPHORA INCARNATA* (BASIDIOMYCETES) ПО RAPD-МАРКЕРАМ

¹ Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича

² Институт генетики и цитологии

Введение. Пеннофора инкарнатная (*Peniophora incarnata* (Pers.) P. Karst.) – это кортициоидный базидиомицет, относящийся к семейству Peniophogaceae порядка Russulales по системе 9-го издания «Словаря грибов» [1]. Гриб имеет полностью распростертые плодовые тела телесного цвета толщиной до 0.7 мм, гладкий или бугорчатый гименофор, тонкостенные гифы с пряжками, гимений содержит глеоцистиды и обильно инкрустированные толстостенные цистиды (лампроцистиды), базидиоспоры гладкие, бесцветные, тонкостенные, эллиптические до слегка вогнутых с внутренней стороны, 6.5–12 × 3–5 мкм. Населяет в основном отмершие неопавшие ветви лиственных деревьев и кустарников и встречается часто, как убиквист в разнообразных типах сообществ умеренного климатического пояса. Сообщается [2] о способности *P. incarnata* поселяться в стволовых ранах живых деревьев ели. Нами гриб наблюдался в ранах живых стволов молодых деревьев *Quercus robur*, а также на коре живых стволов *Syringa vulgaris*, *Acer platanoides*, *Corylus avellana* (таб. 1). В Беларуси вид был обнаружен на ветвях и стволах 34 видов растений.

В связи с широкой экологической амплитудой *P. incarnata* в отношении субстрата была выдвинута рабочая гипотеза о высокой генотипической изменчивости вида и предпринято исследование выборки образцов методом случайно амплифицированных участков полиморфной ДНК (RAPD).

Среди пеннофор исследование методом RAPD-маркирования было проведено М. Mahlariu для *P. quercina* из разных частей ареала (цит. по [3], с. 98). Для *P. incarnata* исследование генома этим методом ранее не проводилось.

Таблица 1. Изученные образцы *Peniophora incarnata*

№ образца ДНК	Инвентарный № образца в гербарии MSK-F и изолята в коллекции культур (MSK-FC)	Место сбора*	Субстрат
23	6459	1	кора живого ствола <i>Syringa vulgaris</i>
24	6485	3	кора живого ствола <i>S. vulgaris</i>
25	6507(1)	4	кора живого (отмирающего) ствола <i>S. vulgaris</i>
26	6506	4	отмерший ствол <i>S. vulgaris</i>
27	6554	2	кора живого ствола <i>Acer platanoides</i> возле зажившей раны срезанной ветви
28	6504a	5	кора живого ствола <i>Corylus avellana</i>
29	6504b	5	отмерший веточный пенек <i>C. avellana</i>
30	6511	5	отмерший веточный пенек <i>C. avellana</i>
63	6742	3	срубленная ветвь <i>Salix caprea</i>
64	6736	2	отмершая неопавшая ветвь <i>A. platanoides</i>
65	6741	1	отмершая неопавшая ветвь <i>Acer sp.</i>
70	6507(2)	4	кора живого (отмирающего) ствола <i>S. vulgaris</i>

* 1 – насаждения внутри жилого квартала по ул. Калиновского, 2 – посадки *Acer platanoides* возле ул. Филимонова, 3 – парк 50-летия Октября, обсадка аллеи, 4 – защитные посадки из *Syringa vulgaris* возле бывш. д. Лошица 2-я, 5 – экспериментальные посадки *Corylus avellana* там же.

ПЦР проводили с 10-членными праймерами OPA-01 (5'-CAGGCCCTTC-3'), OPA-04 (AATCGGGCTG, разработка Operon Biotechnologies, США, синтез – PrimeTech, Беларусь), P36 (CCGAATTCGC), P46 (GGTTGGGGAG), P49 [GACAGCCTAC, разработка Сиволап и др. [5], синтез – Syntol, Россия], согласно условиям для серий OPA и P [4]. Продукты ПЦР разделяли путем электрофореза в 2% агарозном геле с 0.5 мкг/мл бромистого этидия, при напряжении 60 В. Профиля фотографировали в УФ-свете и преобразовывали в графические схемы вручную с помощью компьютерной программы Corel Draw. Схемы позволяют исправить искривления при движении в геле. Ширина линий на схемах отображает ширину светящейся полосы, а сплошное или пунктирное изображение символизирует разную интенсивность свечения. Для оценки сходства между профилями использован коэффициент S, учитывающий интенсивность полос, предложенный J. Schmid, E. Voss и D.R. Soll (1990, цит. по [6]):

$$S_{AB} = \frac{\sum_{i=1}^n [X_{iA} + X_{iB} - |X_{iA} - X_{iB}|]}{\sum_{i=1}^n [X_{iA} + X_{iB}]}$$

где X_{iA} и X_{iB} – значения интенсивности полосы для данного фрагмента в профилях A и B, n – общее количество различных по массе фрагментов в профилях A и B. При сравнении профилей интенсивность самой яркой полосы принималась нами за 1, самой слабо выраженной – 0.1, промежуточные классы задавались с шагом 0.1. Для групп образцов определялось среднее арифметическое значение S_{cp} при сравнении всех возможных пар.

Для двух образцов был поставлен тест на соматическую совместимость вторичных мицелиев. Изоляты были инокулированы на расстоянии 1.6 см на сусло-агар (2% сусло, 1.5% агар-агар) и инкубировались 12 суток при 26°C. В качестве контроля таким же образом выращивались 2 инокулюма, принадлежащие к одному и тому же изоляту.

Результаты и их обсуждение. Использование каждого из 5-ти праймеров позволило получить RAPD-фрагменты для образцов *P. incarnata*. Следует отметить, что изучаемый базидиальный гриб является гетероталличным. Таким образом, препараты ДНК, полученные из мицелия, изолированного из плодовых тел, содержат

генетическую информацию двух разнокачественных гаплоидных генотипов, поскольку обычно клетки такого (вторичного) мицелия содержат по два ядра, полученных от двух первичных мицелиев.

При использовании ПЦР-реагентов из одного и того же набора наблюдалась высокая степень воспроизводимости результатов в двух повторностях RAPD-ПЦР (рис. 2). Отдельные слабо выраженные полосы на электрофоретических профилях не повторялись. Например, для образца 25 не повторился фрагмент в области около 1400 п.н. (рис. 2а). В данном случае профиль справа выглядит в целом бледнее, чем слева, что может быть объяснено меньшим количеством общего ПЦР-продукта, поэтому при сравнении разница в интенсивности полос одного и того же фрагмента между повторностями не учитывается. Для образца 64 не повторились фрагмент 1 в тяжелой области, фрагменты 2 и 6 в средней области, фрагменты 7 и 8 в легкой области (рис. 2б). Близко расположенные фрагменты, содержащие большое количество ПЦР-продукта – № 3, 4, 5 на рис. 2б (справа) оказались слитыми в одну полосу (рис. 2б, слева).

При сравнении продуктов RAPD-ПЦР, полученных с праймером Р36, наблюдалась высокая степень полиморфизма индивидуальных геномов, каждый из которых продемонстрировал уникальный RAPD-профиль, или фингерпринт (рис. 3). При этом существенных различий по фенотипу между образцами не отмечено.

Нами выделены 5 основных маркерных фрагментов для Р36. При их выделении применялось два критерия: фрагменты должны быть интенсивно выражены хотя бы у некоторых образцов, и часто встречаться в общей выборке (включая разные степени интенсивности проявления полосы). Фрагменты, дающие хорошо различимые полосы, т.е. с достаточным количеством ПЦР-продукта, присутствуют у следующих образцов (рис. 3): маркер I (около 2100 п.н.) – 65, 27, 64, 63, 25, 29, 30 (64% выборки); маркер II (около 1900 п.н.) – 65, 27, 64, 29, 30 (45%); маркер III (около 850 п.н.) – 23, 24, 26, 28, 30 (45%); маркер IV (около 800 п.н.) – 24, 63,

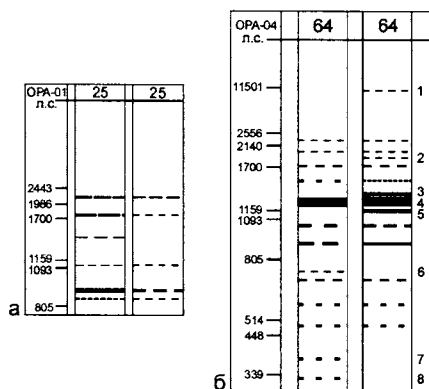


Рис. 2. Воспроизводи-
мость результатов
RAPD-ПЦР, гель-
электрофоретическое
разделение продуктов:
а – для образца 25,
праймер OPA-01, б –
для образца 64, прай-
мер OPA-04. л.с. –
здесь и далее – линия
старта (передняя стенка
лунок). Слева от про-
филей на этом рисунке
и далее нанесены раз-
меры основных фраг-
ментов стандартного
ДНК-маркера *MPstI* в
парах нуклеотидов.

30 (27%). Маркер V (около 370 п.н.) является единственным по-
стоянным фрагментом для всех образцов.

Таким образом, из-за большой изменчивости по RAPD-
маркерам видовая идентификация *P. incarnata* с праймером P36
не представляется возможной. Какой-либо закономерной общно-
сти образцов по RAPD-фрагментам в зависимости от субстрата
(вид растения, мертвая или живая кора) не обнаруживается. Так-
же не наблюдается особых типов профилей (RAPD-паттернов),
характеризующих каждую из популяций. Значение S по P36 со-
ставляет внутри популяций от 0.24 (№ 25 и 26) до 0.53 (№ 24 и
63), $S_{cp} = 0.37$.

Более детально полиморфизм в популяциях *P. incarnata* ил-
люстрируется на примере выборки из 5-й популяции (образцы 28,
29, 30) по четырем праймерам (таб. 2, рис. 3, 4). Образцы 28 и 29
были собраны рядом с одного растения лещины. Для профилей
фингерпринта с праймером P36 наблюдается очень низкое сход-
ство между образцами 28 и 30 ($S=0.18$) и высокое между 29 и 30

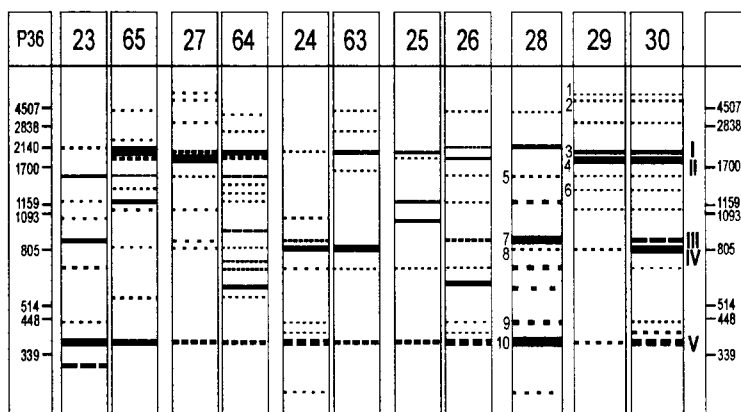


Рис. 3. Гель-электрофоретическое разделение продуктов RAPD-ПЦР с праймером P36 для *P. incarnata*. Профили сгруппированы согласно расположению образцов в популяциях. Римскими цифрами отмечены основные маркеры. Для 28, 29 и 30 арабскими цифрами отмечены общие фрагменты.

($S=0.79$). Анализ показывает, что количество фрагментов, общих для всей данной выборки (таб. 2), мало – 5–20% (таб. 2), причем они, как правило, имеют разное количество ПЦР-продукта, что не делает их абсолютно равнозначными в анализе.

Таблица 2. Характеристика RAPD-профилей для образцов *P. incarnata* № 28, 29, 30

Праймер	Общее количество фрагментов для 28, 29, 30	Количество фрагментов, общих для двух образцов, и их номера	Количество фрагментов, общих для трех образцов, и их номера	% фрагментов, общих для трех образцов	S_{cp}
OPA-04	20	6 (1, 2, 3, 5, 6, 7)	1 (4)	5	0.47
P36	19	7 (1, 2, 3, 4, 6, 7, 9)	3 (5, 8, 10)	16	0.39
P46	13	3 (1, 3, 4)	1 (2)	8	0.34
P49	15	2 (1, 2)	3 (3, 4, 5, 6)	20	0.39

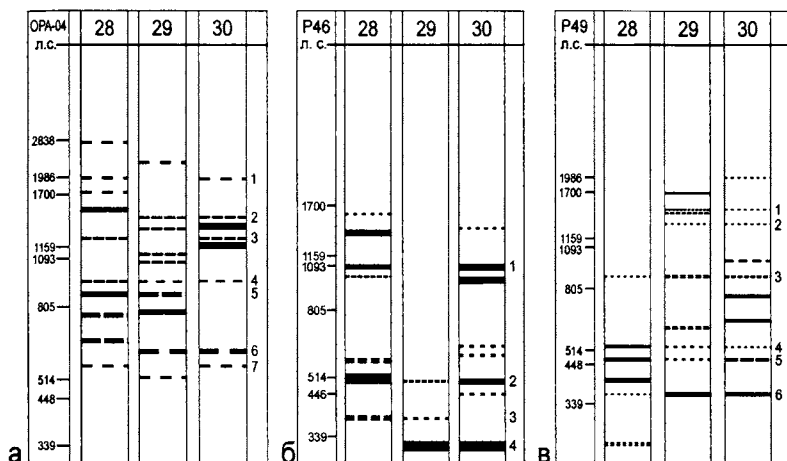


Рис. 4. Гель-электрофоретическое разделение продуктов RAPD-ПЦР для трех образцов *P. incarnata* из одной локальной популяции: а – с праймером OPA-04, б – P46, в – P49. Цифрами справа от профилей отмечены общие фрагменты.

Для образцов 23, 24, 26–30 были сопоставлены продукты RAPD-маркирования с праймером OPA-04 (таб. 3). Сходство профилей наименьшее для пары 23 и 24 ($S=0.22$), наибольшее – для 26 и 30 ($S=0.68$).

При выделении в разное время ДНК из мицелия, изолированного из близко расположенных плодовых тел с одного ствола, получены образцы 25 и 70. Профиля RAPD-ПЦР с OPA-04 для них различаются по наличию фрагментов 1, 7, 8, и имеют набор общих фрагментов 2, 3, 4, 5, 6, 9 (рис. 5). Как известно, принадлежность изолятов к различным индивидам устанавливается благодаря реакции несовместимости их вторичных мицелиев в культуре [7]. Тест на соматическую совместимость между изолятами 25 и 70 не дает явной разграничительной линии на границе контакта мицелиев, но сами изоляты различаются морфологически – ковер мицелия № 25 более низкий, менее густой и слабее пигментирован, что может указывать на некоторое генотипическое различие. В контрольных парах (25/25 и 70/70) наблюдается слияние ковров мицелия без всякой границы.

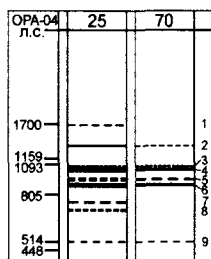


Рис.5. Гельэлектрофоретическое разделение продуктов RAPD-ПЦР с праймером OPA-04 для образцов *P. incarnata* 25 и 70.

Для относительной оценки изменчивости генотипа *P. incarnata* наши данные были сопоставлены с результатами RAPD-маркирования других грибов с одним и тем же праймером. В доступных источниках имеются фотографии RAPD-профилей, полученных с OPA-04: для анаморфного почвенного гриба *Humicola grisea* Traaen [8] и анаморфного гриба-паразита млекопитающих *Paracoccidioides brasiliensis* (Splend.) F.P. Almeida [9]. Это позволило нам вычислить значения коэффициента S (таб. 3). Кроме того, значения S были подсчитаны для пяти образцов кортициоидного базидиомицета *Stereum hirsutum* (Willd.) Gray, собранных нами из одной популяции в монокультуре *Prunus domestica*, и подвергнутых RAPD-маркированию с OPA-04. Существуют данные RAPD-анализа с OPA-04 для моноспоровых изолятов видов рода сморчок – *Morchella* [10], однако они представляются нам неполными, так как авторы сообщают об идентичности всех RAPD-профилей на внутривидовом уровне, не упоминая объем вовлеченной выборки и происхождение аскоспор – от одного или разных плодовых тел.

Поскольку RAPD-фрагменты охватывают весьма незначительную часть всего генома, но при этом разбросаны по нему случайным образом, картину RAPD-полиморфизма правомерно трактовать как некую проекцию, отображающую общую изменчивость генотипа. Полиморфизм ДНК *P. incarnata* по маркерам, получаемым с помощью праймера OPA-04, заметно превышает полиморфизм анаморфных грибов ($S_{\text{ср.}}=0.64-0.70$), и очень близок к таковому у обитателя живой и мертвой древесины *S. hirsutum* ($S_{\text{ср.}}=0.44$). Среди образцов *H. grisea* и *P. brasiliensis* отмечается по одному образцу, сильно отличающемуся от других по своему RAPD-профилю. В таблице 3 даются значения коэффициента

сходства для гомогенной части выборки, исключая данные образцы. S_{cp} в этом случае равен 0.83 и 0.77, что указывает на тенденцию к моноомфности генотипов для несовершенных грибов.

Таблица 3. Коэффициент сходства (S) профилей по RAPD-маркерам, получаемым с праймером OPA-04, для четырех видов грибов

Вид	Количество изученных образцов (изолятов)	S_{cp}	Интервал значений S
<i>Peniophora incarnata</i>	7	0.45	0.22–0.68
<i>Stereum hirsutum</i>	5	0.44	0.31–0.62
<i>Humicola grisea</i> [8]	8	0.70	0.26–0.96
<i>H. grisea</i>	7 образцов из той же выборки, наиболее сходные по RAPD-маркерам	0.83	0.74–0.96
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> [9]	6	0.64	0.34–0.85
<i>P. brasiliensis</i>	5 образцов из той же выборки, наиболее сходные по RAPD-маркерам	0.77	0.74–0.85
<i>Morchella</i> spp. [10]		1	

Несмотря на малую выборку, вполне справедливо говорить о низком сходстве индивидов в популяциях *P. incarnata* по RAPD-маркерам. Высокая генотипическая изменчивость *P. incarnata* позволяет адаптироваться грибу к разным условиям обитания, заселять многочисленные виды аборигенных и интродуцированных древесных растений, а также самые различные типы сообществ – от черноольшаников лабазниковых до сосняков мшистых и разреженных посадок вдоль городских улиц.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, проект Б05-171.

Литература

1. Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Stalpers J.A. (eds). Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 9th ed. Egham, Wallingford: CAB International, 2001. 655 p.
2. Василяускас Р., Стенлид Я. Биология и структуры популяций грибов раневого комплекса в древостоях ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.). В кн.: Стороженко В.Г. и др. (ред. колл.). Грибные сообщества лесных экосистем. Материалы координационных исследований. Москва, Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2000. С. 76–133.
3. Hallenberg N. // Symb. Bot. Upsal. 1995. Vol. 30, No. 3. P. 95–100.
4. Юрченко Е.О., Синявская М.Г. Основы молекулярного маркирования грибной ДНК: Практическое руководство. Минск: Право и экономика, 2007. 101 с.
5. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н., Вербицкая Т.Г. и др. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (Научно-методическое руководство) / Под ред. Ю.М. Сиволапа. Киев: Аграрна наука, 1998. 159 с.
6. Soll D.R. // Clinical Microbiology Reviews. 2000. Vol. 13, No. 2. P. 332–370.
7. Rayner A.D.M. Interconnectedness and individualism in fungal mycelia. In: Sutton B.C. (ed.). A century of mycology. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. P. 193–232.
8. Singh S.K., Vijay B., Mediratta V., Ahlawat O.P., Kamal S. // Current Science (Bangalore). 2005. Vol. 89, No. 10. P. 1745–1749.
9. Hahn R.C., Macedo A.M., Santos N.L., Resende J.C. de P., Hamdan J.S. // Rev. Iberoam. Micol. 2002. Vol. 19. P. 49–51.
10. Singh S.K., Kamal S., Tiwari M., Yadav M.C., Upadhyay R.C. // J. Plant Biochemistry & Biotechnology. 2004. Vol. 13. P. 7–12.

Summary

Peniophora incarnata is an ubiquitous corticioid basidiomycete recorded both on dead and living arboreal plants. Twelve samples of the fungus (secondary mycelia) collected from 5 local populations inside Minsk City were subjected to RAPD-PCR with decamer oligos OPA-01, OPA-04, P36, P46, P49. All five primers produced fragment for the fungus samples, with high degree of reproducibility in the region 0.4–2.5 Kb. The genotype variability was assessed using the coefficient of similarity (S) between profiles, taking into account bands intensities. RAPD analysis showed very low fragment profiles similarity inside populations: for three samples, collected on *Corylus* from the same site, the profiles had from 5 to 20% of common RAPD markers; the arithmetic average S for P36 products inside populations was 0.37. No similar RAPD patterns were observed between *P. incarnata* from the same host species. The average S values for OPA-04 products were

compared for different fungi: for *P. incarnata* $S=0.45$; this is very close to basidiomycete *Stereum hirsutum* ($S=0.44$), and noticeably higher, then for some anamorphic fungi ($S=0.64-0.70$).

Поступила в редакцию 30.10.07